Aus der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
Klinikum Westend
Direktor: Professor Dr. med. G. Neuhaus

VERGLEICH ZWISCHEN MEHREREN METHODEN DES FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN NACHWEISES DES L.E.-FAKTORS UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ANWENDBARKEIT IN DER ROUTINEDIAGNOSTIK

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dorothee Debbert
aus Braunschweig

1972

Aus der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin

Klinikum Westend

Direktor: Professor Dr. med. G. Neuhaus

Vergleich zwischen mehreren Methoden des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises des L.E.-Faktors unter besonderer Berücksichtigung der Anwendbarkeit in der Routinediagnostik!

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dorothee Debbert
aus Braunschweig

Referent: Professor Dr. med. Meta A L E X A N D E R

Koreferent: Professor Dr. med. Günter S T Ü T T G E N

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8. Juni 1972

Inhaltsverzeichnis

			Seite
I.		Einleitung	1
	A	Der Erythematodes	1
	B	Ätiologie und Pathogenese	1
	C	Klinik	4
	D	Laboratoriumsdiagnostik	5
II.		Eigene Untersuchungen	7
	A	Spezielle Fragestellung	7
	B	Methodik	10
	C	Ergebnisse	13
	D	Diskussion	16
		1. Zur Laboratoriumsdiagnostik	16
		2. Zur Methodik	20
		3. Zu den Ergebnissen	25
III.		Zusammenfassung und Schlußfolgerung	26
IV.		Literaturverzeichnis	28

I. Einleitung

A Der Erythematodes

Der viscerale Erythematodes ist keine seltene Erkrankung. Sie steht heute in der Häufigkeit der diagnostizierten Fälle neben der Lymphogranulomatose (1). Es handelt sich meist um Frauen im Alter von 20 - 40 Jahren. Männer sind 6 - 8 mal weniger betroffen. Im Serum der Erkrankten findet sich ein Faktor, der erstmalig von HASERICK (2) als Protein der Gammaglobulinfraktion beschrieben wurde. Dieser Serumfaktor trägt alle Charakteristika eines Autoantikörpers, da er mit autologen Substanzen eine in vitro faßbare Reaktion eingeht (3).

B Ätiologie und Pathogenese

Der viscerale L.E. wird in die Reihe der Autoaggressionskrankheiten gestellt, obwohl das eigentliche pathogenetische Prinzip nicht mit Sicherheit bekannt ist. Es wird angenommen, daß der Bruch der Immuntoleranz, welche in der Embryonalzeit durch direkten Kontakt immunkompetenter Zellen mit Antigenen erworben wird, das initiale Geschehen ist (3, 4, 5).

Als Ursache dieser Entgleisung werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert (4, 7, 8, 9).

1. Autoantikörperbildung gegenüber sequestierten Antigenen:
   Es besteht keine Immuntoleranz gegenüber bestimmten autologen Antigenen nämlich solchen, die normalerweise nicht in den Kontakt mit immunkompetenten Zellen kommen. Wird diese Schranke durchbrochen, beispielsweise durch Virusinfektionen oder Traumatisierung, so gelangen diese Antigene in Blut- und Lymphbahn und lösen bei Berührung mit immunkompetenten Zellen eine Autoantikörperbildung aus.

2. Autoantikörperbildung durch Kreuzreaktion und Haptenisierung:
   Körperfremde Antigene besitzen mit körpereigenen Substanzen gemeinsame antigene Determinanten, die zur Bildung von kreuzreagierenden Antikörpern führen, und es gibt Antigene, denen gegenüber Toleranz besteht, die aber nach Kopplung mit Haptenen, welche durch Virusinfektion oder Kontakt mit chemischen Substanzen hervorgerufen werden können, die Bildung von Antikörpern zur Folge haben, die sich dann natürlich auch gegen das ungekoppelte Material richten, somit also pathogen wirken.

3. Autoimmunisierung durch endogene Mutation immunkompetenter Zellen:
   Hierbei handelt es sich um eine Entartung immunkompetenter Zellen. Die Frage, welche Rolle die

Virusinfektion bei der Veränderung der Immunreaktivität spielt, wird von weiten Kreisen mit zunehmendem Interesse diskutiert (10, 11, 13, 15). 1970 wurde auf dem Kongreß der American Rheumatism Association eine Arbeit vorgelegt, die sich mit dem Virusantikörperspiegel beim visceralen L.E. befaßt(10). PHILLIPS und CHRISTIAN (13) hatten erhöhte Antikörpertiter gegen Myxoviren, Masernviren und Parainfluenza I-Viren gefunden. Bei einer nochmaligen Versuchsreihe an 14 Patienten mit gut dokumentiertem L.E. (alle mit Nierenbeteiligung) und 14 gesunden Kontrollpersonen, ließ sich dieser Befund festigen. Der Virusantikörpertiter war bei den L.E.-Erkrankten von signifikanter Höhe verglichen mit den Normalpersonen.
Zu diesem Bild paßt das Ergebnis von FERENC GYÖRKEY, der mit seinen Mitarbeitern im Nierengewebe von Patienten mit Lupus Erythematodes zytoplasmatische Einschlußkörperchen gefunden hatte, die den Myxoviren ähnlich sind (11, 14). Diese Strukturen zeigten unter dem Elektronenmikroskop einen inneren Durchmesser von 80A, einen äußeren von 230A und eine Länge von ca. 1000A.

Die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen der Verabreichung von chemischen Substanzen und der Entgleisung des Immunapparates ist ebenfalls schon oft erörtert worden (1). Dennoch ist ungeklärt, ob die Einnahme von Chemikalien die Krankheit direkt hervorruft, oder ob ein latenter Zustand von Immun-

abnormalität dadurch beendet und das Krankheitsbild zum Vorschein gebracht wird (41, 42).

Autoimmunphänomene können auch die Folge von immunologischen Defektzuständen sein. Die Thymusdrüse soll eine besondere Rolle in der Entwicklung des Immunsystems spielen (7, 12). Störungen der Thymusfunktion durch Tumoren oder Hyperplasien des Organs äußern sich klinisch durch Autoimmunopathien verschiedener Art.

Bei den schweren L.E.-Fällen mit Organbeteiligung finden sich neben dem Antikernfaktor noch andere Serumfaktoren, solche, die gegen Erythrocyten, weiße Blutkörperchen, Thrombocyten, gegen Gerinnungsfaktoren ebenso wie gegen Nieren-, Herz- und Lebergewebe gerichtet sind (1, 30, 31, 32).

C Klinik

Der viscerale Erythematodes liefert kein einheitliches klinisches Bild. Die Definition des L.E. war zur Zeit seiner Entdeckung im Jahre 1872 durch KAPOSI (16) ausschließlich an das Vorhandensein eines discoiden Erythematodes gebunden. Waren Butterflyerythem im Gesicht und Hauteruptionen vorhanden, wurde differentialdiagnostisch an einen L.E. gedacht. Die Hauterscheinungen müssen jedoch keineswegs immer vorhanden sein. Lang anhaltendes Fieber, Anämie, Leukopenie, körperliche Schwäche, Arthralgien oder Arthritis, Proteinurie, Zylindurie und Mikrohämaturie bei jungen

Frauen sollten auch bei Fehlen der schmetterlingsförmigen Hautveränderungen des Gesichtes an die Diagnose Lupus Erythematodes denken lassen (38). Es scheint, daß die Erkrankung durch eine Reihe von Stress-Stimuli symptomatisch wird, wie zum Beispiel intensive Sonnenbestrahlung, Einnahme von Medikamenten, Schwangerschaft, starke emotionelle Reaktionen und chirurgische Eingriffe (1).

Krankhaft verändert sich das subendotheliale Gewebe der Arterien und Venen, das der Pleura, des Perikards und des Peritoneums (38). Die proliferativ- degenerativ-entzündlichen Gefäßveränderungen in vielen inneren Organen führen zu mannigfachen Organkrankheiten unter dem Bild der Hepatitis, Pseudo-Appendicitis, pneumonischen Infiltraten, Pleuritis, abakterieller Endocarditis, Pericarditis, psychotischen Zuständen und zerebralen Anfällen sowie eines nephrotischen Syndroms (39).

Durch die große Vielfalt des klinischen Bildes steht die Forderung nach möglichst empfindlichen und spezifischen Nachweismethoden, nach kurzer und genauer klinischer Diagnostik schon jahrelang im Vordergrund. Gute Methoden sind immer wieder durch noch bessere abgelöst worden. Dieses Thema wird noch lange für die Forschung interessant sein.

D Laboratoriumsdiagnostik

W. SIEGENTHALER hat in seiner Veröffentlichung: "Laboratoriumsdiagnostik des visceralen Lupus Erythematodes" eine Zusammenfassung der schon bekannten

Methoden gegeben. Er teilt sie auf in elektrophoretische, morphologische und serologische Untersuchungen zum Nachweis antinukleärer Antikörper (30).

Die elektrophoretischen Untersuchungen zum Nachweis des L.E.-Faktors beruhen auf der Entdeckung von HASERICK und BORTZ, daß sich dieser Faktor in der Gammaglobulinfraktion des Patientenserums befindet. Da eine Hypergammaglobulinaemie ein klinisch häufiger Befund ist, der sich bei chronisch-entzündlichen Prozessen, chronischen Leberaffektionen, manchen malignen Tumoren mit Lebermetastasen, beim Plasmocytom, chronischer Polyarthritis, Sepsis lenta, Morbus Boek und anderen erheben läßt, kann die Gammaglobulinvermehrung höchstens zur Bekräftigung der klinischen Diagnose herangezogen werden. Auch immunelektrophoretisch ist eine Identifizierung des L.E.-Faktors nicht möglich (30).

Die morphologischen Untersuchungen zum Nachweis der L.E.-Zelle gehen auf HARGRAVES, RICHMOND und NORTON zurück, die im Jahre 1948 erstmalig das L.E.-Zellphänomen im Knochenmark von an Erythematodes Erkrankten beobachteten und beschrieben:

"Kerne neutrophiler Leukocyten und gelegentlich auch anderer Leukocyten machen eine charakteristische Veränderung durch. Sie verlieren ihre Basophilie, quellen auf und zeigen ein verwischtes Chromatingerüst. Das Cytoplasma löst sich von diesen homogenisierten Kernen. Vitale Phagocyten fressen die freien Kernkörper (21).

Im Augenblick der Phagocytose bietet sich das Bild der L.E.-Zelle.

Zu den serologischen Nachweismethoden gehören mehrere Techniken, von denen aber nicht alle im gleichen Maße für die Klinik verwendbar sind. Neben Hämagglutination, Latex-Partikel, Agglutination (L.E.-Zelltest HYLAND) Komplementfixation und Präzipitation ist der fluoreszenz-mikroskopische Nachweis des L.E.-Faktors für die Diagnostik interessant geworden. Die Begründer der Immunfluoreszenztechniken sind COONS und KAPLAN, denen es erstmalig gelang, Proteine mit Fluoreszeinisocyanat zu koppeln, ohne dabei ihre serologische Spezifität zu verändern (17, 18).

Zuerst wurden mit dieser Methode Antigene bestimmt, wozu ein bekanntes fluochromiertes Antiserum verwendet wurde(17 Später drehte man die Fragestellung um und ermittelte durch Fluochromierung eines Serums die in diesem Serum kreisenden Antikörper, indem man sie mit einem bekannten Antigen reagieren ließ. Der entstehende Antigen-Antikörper komplex war unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

II. Eigene Untersuchungen

A Spezielle Fragestellung

Die Aufgabe dieser Arbeit soll darin bestehen, festzustellen, ob und unter welchen Umständen sich die immunhistologische L.E.-Diagnostik in die tägliche Routine eines klinischen Labors aufnehmen läßt, und mit welchen

Mitteln sie am leichtesten durchführbar ist.

Untersucht wurden:

15 klinisch gesicherte Fälle von Erythematodes visceralis,

3 Fälle von progressiver Sklerodermie,

1 Fall von Dermatomyositis,

2 Fälle von histologisch gesichertem cutanem L.E. ohne viscerale Beteiligung

15 normale Kontrollpersonen.

Zur Zeit der Blutabnahme befanden sich nur 7 Patienten in subakutem bis akutem Zustand und deshalb in stationärer Behandlung. Die übrigen standen wegen der chronisch verlaufenden Krankheit unter der Kontrolle verschiedener Polikliniken (siehe Tabelle 1).

	Name	Geschlecht	Alter bei Beginn der Erkrankung	Diagnose	Zustand zur Zeit der Blutabnahme	Corticosteroide zur Zeit der Blutabnahme
1.	M. L.	weiblich	35	visc. L.E.	chronisch	Urbason 8 mg/die
2.	N. H.	weiblich	47	visc. L.E.	chronisch	keine
3.	P. I.	weiblich	24	visc. L.E.	subakut	Urbason 2 mg/die
4.	R. E.	weiblich	32	visc. L.E.	chronisch	Urbason 4 mg/die
5.	F. H.	weiblich	21	visc. L.E.	chronisch	keine
6.	Z. I.	weiblich	21	visc. L.E.	chronisch	10 mg Prednisolon/die
7.	K. I.	weiblich	39	visc. L.E.	chronisch	keine
8.	D. I.	weiblich	30	visc. L.E.	subakut	Elestol 1 x 1 Drg./die
9.	V. M.	weiblich	26	visc. L.E.	chronisch	Decortilen 12 mg/die
10.	K. I.	weiblich	51	visc. L.E.	chronisch	Imurel 100 mg/die
11.	K. K.	männlich	19	visc. L.E.	akut	40 mg Urbason/die
12.	G. M.	weiblich	42	visc. L.E.	chronisch	keine
13.	E. G.	männlich	36	visc. L.E.	akut	Prednisolon 100 mg/die
14.	L. H.	weiblich	24	visc. L.E.	akut	24 mg Urbason/die
15.	C. W.	weiblich	30	visc. L.E.	akut	50 mg Prednisolon ISN/die
16.	K. V.	weiblich	39	cutaner L.E.	chronisch	keine
17.	T. W.	männlich	41	cutaner L.E.	chronisch	Celestan 1,5 mg/die
18.	K. E.	weiblich	56	progressive Sklerodermie	akut	keine
19.	P. E.	weiblich	52	progressive Sklerodermie	chronisch	keine
20.	K. E.	männlich	58	progressive Sklerodermie	chronisch	keine
21.	B. T.	weiblich	40	Dermatomyositis	chronisch	Predni-H 10 mg/die

Methodik

Der Fluoreszenz-antihuman-gammaglobulintest wurde nach Angaben von C. STEFFEN (17) ausgeführt. Der von ihm beschriebene indirekte Test diente als Grundlage.

"Das zu untersuchende Serum mit Antikörperspezifität wird mit dem Antigen (histologischer Schnitt) in Reaktion gebracht. Falls eine spezifische Reaktion eintritt, ist sie noch nicht sichtbar. Überschüssiges, nicht spezifisch gebundenes Serum wird durch Waschung entfernt. Sodann wird ein fluochromiertes Antiglobulinserum dem Schnitt zugesetzt. Dort, wo eine Reaktion zwischen Antigen und antikörperhaltigem Serum eingetreten ist, bindet sich das fluochromierte Antiglobulinserum an der Gammaglobulineigenschaft der Antikörper ab. Nach Auswaschung des überschüssigen, nicht gebundenen fluochromierten Antiglobulinanteils wird der Bereich der spezifisch verursachten Immunfluoreszenz mikroskopisch ermittelt (STEFFEN).

Nebeneinander wurden vier Versuchsreihen mit jeweils abgewandeltem antigenem Material durchgeführt.

1) Mäuseleber frisch, Quetschpräparat
2) Mäuseleber gefroren, Kryostatschnitt
3) Mäuseleber homogenisiert, gefroren, Kryostatschnitt
4) Menschliche Leukocyten vorbehandelt nach der Methode von MARMONT, Ausstrichpräparat

Ad 1)

Die Leber einer gerade getöteten Maus wird vom Organverband getrennt. Sie wird mit der Hand geschnitten, auf einen Objektträger aufgebracht und nach der Methode zur Herstellung eines Sternal-Punktat-Ausstrichs behandelt. Das Quetschpräparat wird sodann mit Coons Puffer, pH 7,2 überschichtet. Der Puffer kann von allen Apotheken bezogen werden. Das Präparat verbleibt 30 Minuten, gut mit Puffer überschichtet, in einer Petrischale, die durch Einlegen eines nassen Filterpapiers wie eine feuchte Kammer wirkt. Das Eintrocknen muß verhindert werden. Es sollte eine Raumtemperatur von ca. 24°C herrschen. Nach der ersten halben Stunde erfolgt dann das Überschichten mit dem Antikernfaktoren enthaltenen Patientenserum. Den Puffer läßt man vorher vorsichtig am schräg gehaltenen Objektträger ablaufen. Hilfreich ist dabei ein Stück Zellstoff, welches die Flüssigkeit absaugt. Es muß darauf geachtet werden, daß das Präparat nicht vom Puffer weggewaschen wird. Wann immer mit Flüssigkeit überschichtet wird, muß die die Flüssigkeit enthaltende Pipette am Rande des Objektträgers aufgesetzt werden und nicht direkt auf das Präparat gerichtet sein.

Das mit dem Patientenserum überschichtete Gewebe verbleibt ebenfalls 30 Minuten in der feuchten Kammer. Das überschüssige, nicht spezifisch gebundene Serum wird mit Puffer ausgewaschen. Das Präparat 15 Minuten mit Puffer überschichtet stehen lassen, danach erneutes Waschen. Nun erfolgt das Aufbringen des Antihuman-

gammaglobulins, welches mit Fluoreszeinisothiocyanat markiert ist. Man läßt es 30 Minuten in der feuchten Kammer einwirken. Das überstehende Antihumangammaglobulin wird durch zweimaliges Waschen mit Puffer entfernt. (30 Minuten). Das Mikroskopieren muß unmittelbar angeschlossen werden.

Ad 2)
Der Versuchsablauf ist hier der gleiche wie bei 1), nur wird das antigene Material unterschiedlich behandelt. Die frisch präparierte Mäuseleber wird mit flüssigem CO_2 in wenigen Sekunden tiefgefroren. In einem Kryostaten werden von dem Gewebsblock Gefrierschnitte von einer Dicke von 6µ hergestellt, die ohne Eiweißglyzerin auf Objektträger aufgebracht werden. Die COONS-Pufferlösung sollte bei der Hand sein, um ein sofortiges Überschichten des Präparates vorzunehmen.

Ad 3)
Die Mäuseleber wird in einem Reagenzglas mit Hilfe eines Glasstabes zerkleinert und solange gerührt, bis eine homogene Masse entsteht. Diese wird mit flüssigem CO_2 tiefgefroren und im Kryostaten geschnitten. Der weitere Versuchsablauf erfolgt wie oben.

Ad 4)
Menschliche Leucocyten werden nach der Methode von MARMONT vorbehandelt (29, 33, 34, 35)

Man bringt 5 ml Venenblut eines Patienten mit möglichst hoher Senkungsgeschwindigkeit in einen Erlenmeyerkolben (glatter Boden) und fügt pro ml Blut 3 Glasperlen hinzu. Das Gefäß wird mit einem Stopfen verschlossen und 5 Minuten bis zur völligen Defibrinierung mit der Hand geschüttelt, anschließend 20 Minuten im Schüttelapparat weitergeschüttelt. Das Blut wird durch Gaze filtriert und in einem Haematokritröhrchen bei 2000 Umdrehungen in der Min. 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abheben des überstehenden Serums wird die Leucoschicht vorsichtig abpipettiert und in ein Pandyröhrchen gegeben. Dort läuft der Versuch wie oben beschrieben ab. Zugefügter Puffer, Serum und fluochromiertes Antihumangammaglobulin werden jeweils durch Zentrifugieren entfernt. Zum Schluß wird die behandelte Leucocytenanreicherung auf Objektträgern ausgestrichen und unter das Fluoreszenzmikroskop gebracht.

C Ergebnisse

Versuch 1:

Tritt nach Durchführung des Versuchs eine Kernfluoreszenz auf, so ist sie nur auf einige wenige Stellen des Präparates beschränkt. Es handelt sich um eine homogen leuchtende Fluoreszenz des ganzen Kernes. Überschüssiges, durch die Waschung nicht entferntes fluoreszierendes Gammaglobulin ist durch Farbe

(hellgelb) und Form von den wahren Antigen-Antikörperkomplexen, die eine leuchtend hellgrüne Fluoreszenz zeigen, gut abgrenzbar.

Versuch 2:
Positive Ergebnisse sind bei diesem Versuch schwer von negativen zu unterscheiden, da eine Kernfluoreszenz, tritt sie überhaupt auf, ausschließlich auf den Rand des Präparates beschränkt bleibt. Eine Unterscheidung zu verbliebenem, nicht gebundenem fluoreszierendem Gammaglobulin ist hier schwer zu treffen.

Versuch 3:
Hier läßt sich mühelos die Aussage: Positiv bzw. Negativ machen. Im Falle eines positiven Ergebnisses läßt sich im gesamten unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Bereich eine Kernfluoreszenz darstellen, die vom gesamten Kern ausgeht. (siehe Abb. 1)

Tabelle 2

ERGEBNISSE

	Patienten	Diagnose	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
1.	M. L.	visc. L.E.	+	-	++	-
2.	N. H.	visc. L.E.	-	-	-	-
3.	P. I.	visc. L.E.	-	-	++	-
4.	R. E.	visc. L.E.	+	?	+	-
5.	F. H.	visc. L.E.	+	?	+	-
6.	Z. I.	visc. L.E.	+	?	+	-
7.	K. I.	visc. L.E.	+	?	++	-
8.	D. I.	visc. L.E.	+	-	++	-
9.	V. M.	visc. L.E.	-	-	-	-
10.	K. I.	visc. L.E.	+	?	++	-
11.	K. K-J.	visc. L.E.	+	+	++	-
12.	G. M.	visc. L.E.	+	?	+	-
13.	E. G.	visc. L.E.	+	+	+++	-
14.	L. H.	visc. L.E.	++	?	+++	-
15.	C. W.	visc. L.E.	+	-	+	-
16.	K. V.	cut. L.E.	-	-	-	-
17.	T. W.	cut. L.E.	-	-	-	-
18.	K. E.	prgr. Sklerodermie	-	-	-	-
19.	P. E.	prgr. Sklerodermie	-	-	-	-
20.	K. E.	prgr. Sklerodermie	-	-	-	-
21.	B. T.	Dermatomyositis	-	-	-	-

Die Normalfälle zeigten alle ein negatives Ergebnis.

Versuch 4:

Bei der Durchführung dieser Art des Testes kommen bei Bearbeitung aller Seren nur zweimal unter dem Fluoreszenzmikroskop Komplexe zur Darstellung, die in Form und Größe durchaus den echten Antigen-Antikörperkomplexen gleichen, nur fehlt die Fluoreszenz fast vollständig. Im gesamten, unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Bereich lassen sich nur ein bis zwei dieser lichtschwachen, blaß-grünen Elemente erkennen. (Siehe Tabelle 2)

D Diskussion

1. Zur Laboratoriumsdiagnostik

Wie schon eingangs erwähnt, haben die elektrophoretischen Methoden zum Nachweis des L.E.-Faktors keinen großen diagnostischen Wert, sondern unterstreichen nur die durch andere Methoden ermittelte Diagnose, da eine Vermehrung der Gammaglobulinfraktion kein ausreichendes Beweisstück für das Vorhandensein eines Erythematodes ist.

Die morphologischen Untersuchungen, die auf dem Nachweis der L.E.-Zelle beruhen, haben den Vorteil der Einfachheit und sind deshalb sicher in jeder Klinik durchführbar. Trotz Erfassung von 80 % aller L.E.-Erkrankten (39) darf dieser Test in Bezug auf die Empfindlichkeit und Spezifität nicht überbewertet werden.

1. Es muß ein bestimmter Titer von L.E.-Faktor im Blut sein, ehe es zur Bildung von L.E.-Zellen kommt.
2. Es gibt Pseudo-L.E.-Zellen und L.E.-ähnliche Zellen, die zu diagnostischen Schwierigkeiten führen. (28)
3. L.E.-Zellen lassen sich auch in 20 % der Fälle bei Dermatomyositis, Periarteriitis nodosa und progressiver Sklerodermie nachweisen (7, 30).

Eine bedeutende Verbesserung der morphologischen Untersuchungen ist der Nachweis der L.E.-Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Akridinorange (28), welches durch hohe Affinität zu den Nukleinsäuren eine intensive Kernfärbung bewirkt. Mit diesem Verfahren lassen sich sicher alle L.E.-Zellen von nicht L.E.-Zellen unterscheiden.

Die bekanntesten Methoden der Serodiagnostik sind der L.E.-Latextest, der Antiglobulinkonsumptionstest und die Immunfluoreszenzmethode.

Der von der Firma Hyland-Travenol herausgegebene Test beruht auf einer Agglutinationsreaktion, welche durch die Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes hervorgerufen und mit Hilfe von Polystyren-Latexpartikeln sichtbar gemacht wird. Untersuchungen haben ergeben, daß der Test nur bei denjenigen Patienten

positiv war, bei denen die meisten L.E.-Zellen nachgewiesen werden konnten (34). Diese Tatsache deutet darauf hin, daß der Test wohl spezifisch ist, daß für eine positive Reaktion aber ein hoher Titer des L.E.-Faktors im Patientenserum vorhanden sein muß, und somit die Empfindlichkeit gering ist.
Die Treffsicherheit dieses Verfahrens liegt beim generalisierten Erythematodes zwischen 60 und 90 % (39).

Der Antiglobulinkonsumptionstest ist ein seit 1954 bekannter Nachweis von Antikörpern gegen Zell - oder gewebsgebundene Antigene (17). Der im Patientenserum kreisende Antikörper wird mit einer antigenen Testzelle oder mit einem subzellulären Testantigen ermittelt. Dieser Test ist beim generalisierten Erythematodes in 80 - 100 % der Fälle positiv (39).

Die Fluoreszenzantikörpermethode als immunhistologischer Nachweis antinukleärer Faktoren wird von SELIGMAN (19) für die empfindlichste überhaupt gehalten. Hier liegt die Quote der erfaßten Fälle bei 100 %. Ist keine Kernfluoreszenz vorhanden, kann ein L.E. ausgeschlossen werden. Das positive Ergebnis sagt jedoch mit Vorbehalt etwas über das Bestehen oder Nichtbestehen eines L.E. aus, da auch primär chronische Polyarthritis, chronische Lebererkrankungen, Colitis ulcerosa, Hashimoto Thyreoiditis, Myastenia gravis, Dermatomyositis progressive Sklerodermie und Periarteriitis nodosa

oftmals eine positive Kernfluoreszenz zeigen (1, 20, 21).

Es ist müßig über die Fluoreszenzantikörpermethode zu sprechen, ohne dabei das Auftreten von unspezifischer Kernfluoreszenz zu erwähnen. BRUCHHAUSEN (22) hat in einer Versuchsserie festgestellt, daß Seren gesunder Probanden in 4 % der Fälle eine positive Kernfluoreszenz zeigen. Ebenfalls lassen sich nach mehrfachem Einfrieren und Auftauen menschlicher Normalseren antinukleäre Faktoren nachweisen (23), die vor dieser Prozedur nicht vorhanden waren. Es wurde beobachtet, daß nach langer Verabfolgung von Procainamid bei den Behandelten ein lupus ähnliches Syndrom auftritt, mit positivem L.E.-Zellphänomen und positivem Coombs-Test, wobei noch zu klären bleibt, ob durch diese Medikation ein latent idiopathischer Erythematodes aktiviert wurde, oder ob es sich um eine neue Erkrankung handelt (24).

Ebenfalls interessant ist die Entdeckung von BOLE (25), der bei gesunden Studentinnen nach Einnahme von Ovulationshemmern rheumatoide und lupoide Symptome fand, mit gleichzeitigem Auftreten des L.E.-Zellphänomens. Auch der Nachweis des antinukleären Faktors fiel positiv aus (26).

Da positive Ergebnisse auch bei anderen Erkrankungen des Bindegewebes auftreten, scheint die große Empfindlichkeit des Testes mit einem gewissen Verlust der Spezifität einherzugehen. Es weist aber auch darauf

hin, daß zwischen allen Kollagenosen ein ursächlicher Zusammenhang bestehen könnte.

Bei den im Verlauf dieser Arbeit untersuchten Seren fielen die Ergebnisse von Patienten mit progressiver Sklerodermie und Dermatomyositis negativ aus.

2. Zur Methodik

Das Patientengut

Alle untersuchten Seren stammten von Patienten, bei denen ein Erythematodes schon vor Jahren diagnostiziert wurde. Zur Zeit der Blutabnahme standen alle unter Cortikosteroid oder Antimalariatherapie (Chloroquindiphosphat) in kleinen Erhaltungsdosen (bei chronischem Verlauf). Bei den akuten Fällen handelt es sich jeweils um einen neuen Schub der Erkrankung. Ein in solch akutem Zustand eingelieferter Patient (E. G.) zeigte von dem am Tag der Einlieferung entnommenen Blut einen +++ positiven Nachweis des antinukleären Faktors.

Nach zweiwöchiger Therapie mit Prednisolon 100mg/die fiel der Test negativ aus. Der Titer des L.E.-Faktors muß zu dieser Zeit niedriger gewesen sein als am Tag der Aufnahme. Dennoch erlag der Patient 5 Wochen später seinen Nierenkomplikationen, ohne Wiederkehr eines positiven Nachweises unter dem Fluoreszenzmikroskop. Ein direkter Zusammenhang zwischen Titerhöhe des L.E.-Faktors und Schweregrad der Erkrankung scheint nicht zu bestehen. Ein Zusammenhang zwischen

Medikation und Titerhöhe des Faktors muß vorhanden sein (27).

Das antigene Material:

Da die meisten Zellkern-Autoantikörper weder organ- noch speziesspezifisch sind, können verschiedene menschliche und tierische Präparate als Antigene Verwendung finden.

Der L.E.-Faktor reagiert mit dem Nukleoproteid des Zellkerns und wird von freiem Kernmaterial quantitativ meßbar absorbiert (33, 20, 21, 36). Soll eine Reaktion zwischen Antigen und Antikörper stattfinden, ist es unerläßlich, bei der Präparation des antigenen Materials eine Schädigung des Cytoplasmas vorzunehmen, da es dem Antikörper nicht möglich ist, über ein intaktes Cytoplasma eine Verbindung mit der Kernsubstanz einzugehen.

Ein in Formalin fixiertes Präparat stellt für diesen Test ein völlig unbrauchbares Material dar.

Sollen frisch eingefrorene Gewebe für spätere Versuche gelagert werden, ist eine Tiefkühleinrichtung, die bis auf -90°C hinunter geht, erforderlich. Ein solcher Tiefkühlschrank kann vielfach nicht vorausgesetzt werden, so daß die Beschaffung eines frischen Präparates wesentlich billiger ist, zumal ein Tierstall in allen größeren Kliniken vorhanden ist. Zur Herstellung von Gefrierschnitten muß ein Kryostat vorhanden sein, dessen Anschaffung eine erhebliche Belastung des Labors dar-

stellt, wenn auch die in Versuch 3 verwandten Gefrierschnitte die besten Ergebnisse brachten. Siehe Ergebnisdiskussion)

Der Puffer:

Zur Auswaschung von nicht gebundenem Patientenserum und überschüssigem, fluochromierten Antihuman-gamma-globulin wurde Coons-Puffer verwandt mit einem pH von 7,2.

Er setzt sich zusammen aus: Na-Barbiturat 20,6 g, NaCl 85,0 g, 1n HCL 80,6 ml, Aqua dest ad 5l.
Für den Versuch muß der Puffer eins zu eins mit Aqua dest verdünnt werden. Wird er lange im Labor gelagert, sollte zwischenzeitlich eine Kontrolle des pH's durchgeführt werden.

Das Patientenserum:

Es wird von den L.E.-Patienten Blut ohne Antikoagulantienzusätze abgenommen und in der Zentrifuge bei 2000 Umdrehungen 10 Minuten lang Serum gewonnen. Dieses Serum wird in normalen Reagenzgläsern mit Stopfen in einem Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

Da bei allen untersuchten Seren die Aktivität in bezug auf die Kernfluoreszenz nach mehrmaligem Auftauen und wieder Einfrieren nachließ und um auf der anderen Seite, wie von BRUCHHAUSEN angegeben, das Auftreten unspezifischer Kernfluoreszenz zu verhindern, ist es ratsam, das Serum sogleich nach Gewinnung in kleine

Portionen aufzuteilen, soll der Test mehrmals durchgeführt werden. Vor der Verarbeitung muß das Serum auf Zimmertemperatur gebracht werden.

Gerade bei der Durchführung dieses Testes ist immer daran zu denken, daß es Substanzen gibt, die die Fluoreszenz bestimmter Fluochrome stören oder gar völlig auslöschen. Hämoglobin gehört hierzu, so daß hämolytische Seren sich für die Markierung nicht eignen (18).

Das fluochromierte Antihumangammaglobulin

Das Fluoreszeinisocyanat (FIC), der klassische Farbstoff der Fluoreszenz-Immunologie, ist wegen seiner geringen Stabilität und des recht schwierigen Herstellungsverfahrens durch das von RIGGS u.Mitarb. vorgestellte Fluoreszeinisothiocyanat ersetzt worden (18). Das FITC ist einfacher zu synthetisieren, ist ungefährlicher, stabiler und deshalb auch einfacher mit Proteinen zu konjugieren (18). Es erscheint unter dem Fluoreszenzmikroskop in gekoppeltem Zustand in leuchtend hellgrüner Farbe. Es wurde zur Durchführung dieses Testes von der Firma Hyland-Travenol, München bezogen.

Es muß nach Lösung portionsweise abgefüllt und eingefroren werden, da es nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren an Aktivität einbüßt.

Das Mikroskopieren mit dem Fluoreszenzmikroskop

Ziel der Fluoreszenzmikroskopie ist die Auffindung eines im chemischen Sinne spezifisch fluoreszierenden Farbstoffes, der in ebenso spezifischer Weise nur mit einem genau definierten Substrat reagiert und diesem Leuchtkraft verleiht (40).

Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat eine charakteristische spektrale Absorptions- oder Anregungskurve (für FITC besonders 360 nm) und ein charakteristisches Emmissionsspektrum. Die Lichtquelle und die Optik sind so zu wählen, daß das Präparat möglichst von jenem Teil des Anregungsspektrums getroffen wird, das das Maximum an emitiertem Licht hervorruft. Das anregende Licht muß so gefiltert sein, daß es kein Licht des wahrnehmbaren emitierten Spektrums enthält. (18). Es wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss gearbeitet. Als Anregungslichtquelle wurde die Quecksilberdampflampe HBO 200 benutzt. Hinter dem Objekt wurde ein Sperrfilter verwandt, der nach Möglichkeit das gesamte anregende Licht absorbiert, aber das Maximum des vom Fluochrom emitierten Lichtes durchläßt. Die Verwendung von Durchlicht erwies sich der von Auflicht überlegen.

Ist das anregende Licht von Fluochrom absorbiert worden, so läßt sich eine intensive Fluoreszenz nur 2 - 3 Minuten nach Auftreffen des ersten Lichtstrahls ermitteln. Aus diesem Grunde sollte das Mikroskopieren unmittelbar nach Versuchsende durchgeführt werden.

3. Zu den Ergebnissen:

Versuch 1 ist leicht, d.h. ohne große Aufwendungen praktisch in jedem Labor durchführbar. Fluoreszenzmikroskop und Tiefkühltruhe stehen, da sie Grundvoraussetzungen des Testes sind, hier nicht zur Debatte. Die Die Maus wird am Tage des Testes aus dem Tierstall geholt. Die Herstellung der Handschnitte und des Quetschpräparates bereiten keine Schwierigkeiten. Der Coons-Puffer pH 7,2 wird aus der Apotheke bezogen. Die Haftung des Präparates auf dem Objektträger während der Waschung mit Puffer stellt das einzige Problem dieses Versuches dar. Um ein Wegschwemmen zu verhindern, muß der Puffer mit äußerster Vorsicht mit einer Pipette aufgetragen werden. Die Ergebnisse sind, wie oben erwähnt, ausreichend.

Der für die Herstellung von Gefrierschnitten in Versuch 2 benötigte Kryostat stellt eine Belastung des Labors dar, die in keinem Verhältnis zu den gewonnenen Ergebnissen steht. Einige wenige fluoreszierende Komplexe treten nur am Rande des Präparates auf und sind von dem überstehenden, durch die Waschung nicht entfernten Fluochrom schwer zu unterscheiden. Die mit unzerstörtem Zellverband eingefrorene Leber scheint zum Nachweis von Antikernfaktoren unbrauchbar zu sein, die Zerstörung des Cytoplasmas bei der Herstellung der Gefrierschnitte nicht auszureichen.

Auch für die Durchführung von Versuch 3 wird ein Kryostat benötigt, nur stehen hier Aufwand und Ergebnisse in

wesentlich ausgewogenerem Verhältnis. Durch die Homogenisierung der Leber liegt genügend Kernsubstanz für die Antigen-Antikörperreaktion frei, so daß eine einheitliche Kernfluoreszenz sichtbar ist. Die Haftung der Gefrierschnitte auf dem Objektträger ist vortrefflich und nicht mit der aus Versuch 1 zu vergleichen. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des L.E.-Faktors ist wohl in dieser Form mit der größten Zuverlässigkeit durchführbar.

Versuch 4 im Pandyröhrchen ist durch das ständige Abzentrifugieren überstehenden Materials zeitlich aufwendiger als die anderen Versuche. Die Ergebnisse sind nicht zufriedenstellend, da eine echte Fluoreszenz bei keinem der untersuchten Seren auftritt.

III. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Es wird die Möglichkeit diskutiert, den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des L.E.-Faktors in die tägliche Routinediagnostik eines klinischen Labors aufzunehmen. Der Test soll so durchgeführt werden, daß die Belastung des Labors nicht zu groß ist, auf der anderen Seite aber kein Genauigkeitsverlust entsteht. Als Grundlage diente die von C. STEFFEN vorgelegte indirekte Methode, bei der mit Hilfe eines bekannten Antigens ein im Patientenserum kreisender Antikörper (L.E.-Faktor) bestimmt wird. Kommt es zur spezifischen Reaktion zwischen Antigen und Antikörper, so kann diese mit einem fluochromierten Antihumangammaglobulin sichtbar gemacht werden. Es werden vier Versuche mit jeweils abgewandeltem antigenen Material besprochen,

bei denen sich Versuch 3 mit homogenisierter, schnellgefrorener und gefriergeschnittener Mäuseleber allen anderen als überlegen erweist. Die im Zellverband intakte Mäuseleber erscheint unbrauchbar, der Versuch im Pandyröhrchen verläuft ohne positives Ergebnis. Ein Kryostat zur Herstellung von Gefrierschnitten wie sie für Versuch 3 benötigt werden, kann vielfach nicht vorausgesetzt werden. Versuch 1, mit handgeschnittener und gequetschter Leber steht zwar in der Durchführung und den Ergebnissen hinter 3 zurück, kann aber dennoch als brauchbar angesehen werden.

Literatur und eigene Untersuchungen wurden diskutiert.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

(1) P.A. TUMULTY — Systemic Lupus Erythematosus, aus Harrison's "Principles of Internal Medicine" Sixth Edition, 1962 - 1967 Page.

(2) J.R. HASERICK, L.A. LEWIS, D.W. BORTZ — Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus. Determination of Gammaglobulin as specific plasma fraction. Amer. J. Med. Sci. 219:660 (1950)

(3) F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ — Autoimmunisierung als pathogenetisches Prinzip. Der Internist, 2. Jahrgang, Heft 1, Januar 1970

(4) C. STEFFEN — Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968 Autoimmunisierung, Autoallergie und Autoimmunaggression

(5) R.E. BILLINGHAM, L. BRENT, P.B. MEDAWAR — Nature, (Lond.) 172, 603 (1953)

(6) D. MAAS — Antikernfaktoren, Nachweis und klinisch diagnostische Bedeutung. Med. Klin. 18. Juli 1969 (29), 64. Jahrgang (1302)

(7) K.H. MEYER zum BÜSCHENFELDE, J. KNOLLE — Lupus erythematodes visceralis Med. Klin. 64, 1297 (1969)

(8) F.M. BURNET — The clonal selection theory of acquired immunity, S. 139, Univ. Press. Cambr. 1959

(9) P.R.J. BURCH — Autoimmunity: Some etiological aspects. Lancet 1: 1253-1257 (1963)

(10) E.R. HURD, W. DOWDLE, H. CASEY, M. ZIFF — Virus Antibody Level in Systemic Lupus Erythematosus. Dallas Texas, Atlanta, Ga. American Rheumatism Association Abstracts: 24 (1970)

(11) W.L. NORTON — Induktion von Kollagenkrankheiten durch Viren liegt im Bereich der Möglichkeit. Medical Tribune Nr. 37, September 1969 S. 24

(12) W.J. IRVINE — Modern trends in immunology Vol. 2, P. 250, London: Butterworth (1967)

(13) P.E. PHILLIPS, C. CHRISTIAN — Virologic studies in systemic lupus erythematosus American Rheumatism Association Abstracts: 26 (1970)

(14) F. GYÖRKEY, KYUNG WHAN MIN, P. GYÖRKEY — Myxovirus-like structures in human Collagenen Disease American Rheumatism Association Abstracts: 2 May, June (1969)

(15) W.L. NORTON — Chronic endothelial inclusions in systemic lupus erythematosus American Rheumatism Association Abstracts: 1, (1969)

(16) P.A. MIESCHER
D. RIETHMÜLLER
Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus
Seminars in Hematology, Vol. 2, No. 1, (1965)

(17) C. STEFFEN
Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. In-vitro-Methoden
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
S. 622, 1968

(18) G. POETSCHKE
Fluoreszenzmarkierte Antikörper in Forschung und Diagnostik. Allgemeines und Methodisches
Ärztl. Lab. 10:353-360 (1964)

(19) M. SELIGMANN
The detection of antibodies in disseminated lupus erythematosus. In: Immunological methods, a symposion. Ed. Ackroyd J.F. Oxford (1964)

(20) A. BEICKERT
Lupus Erythematodes-phänomen und die antinukleären Faktoren
Jena, Fischer (1963)

(21) P. MIESCHER
K.O. VORLAENDER
Der viscerale Erythematodes in: Klinik und Forschung und das Problem der Autoantikörper
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1961)

(22) BRUCHHAUSEN, D.
Über unspezifische Kernfluoreszenz und ihre Bedeutung für die immunhistologische L.E.-Diagnostik
Blut Band XVII, S. 93 - 110 (1963)

(23) R.J. LAFFIN
Detection of antinuclear globulin in normal serum
Fed. Proc. 22,2,217 (1963)

(24) S.E. BLOMGREN, J.J. CONDEMI, J.H. VAUGHAN
Procainamid-induced lupus syndrom
American Rheumatism Association Abstracts: 55 (1969)

(25) G.G. BOLE
Rheumatic symptoms and serological abnormalities induced by oral contraceptives
Lancet, 1969/1, 323

(26) I. WILBERT, I. HILLMER, W. HUNSTEIN, P. REISERT, U. KABOTH, W. CREUTZFELDT
Einfluß oraler Ovulationshemmer auf klinisch chemische Normalwerte
Dtsch. Med.Wschr. 94 (1969) 844

(27) E.L. DUBOIS
Prednisone and Prednisolone in the treatment of Systemic Lupus Erythematosus.
J.A.M.A. 167:1590 (1968)

(28) R. THOM, M. ALEXANDER
Eine neue Methode zum Nachweis von L.E.-Zellen
Blut, Zeitschrift für Blutforschung Band 12, S. 193 - 199 (1966)

(29) R. THOM, M. ALEXANDER, G. SCHEIB
Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von L.E.-Zellen, Sonderdruck aus Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 70. Kongreß (1964)

(30) W. SIEGENTHALER
Laboratoriumsdiagnostik des visceralen Lupus Erythematodes
Dtsch. Med. Wochenschrift 90. Jahrgang, Nr. 22, S. 1009-1010 (1965)

(31) A. SCHIRMER
Med. Klin. 59, S. 1729, (1964)

(32) W. SIEGENTHALER
R. HEGGLIN
Ergebn. inn. Med. Kinderheilkunde 7 (1956) 373

(33) B. WEIGOLD
Über eine Methode zur quantitativen Erfassung des L.E.-Zellphänomens unter besonderer Berücksichtigung fördernder und hemmender Einflüsse
Dissertation aus der Med. Klin. der Freien Universität Berlin (1969)

(34) M. ALEXANDER
W. ROTHENBERGER
Zur Diagnostik des Erythematodes disseminatus
Med. Klin. 59, Nr. 6, S. 205-209 (1964)

(35) A. MARMONT
M.A. PIUMA
G. CAPONI
Eine einfache Methode zur Auslösung des L.E.-Phänomens durch mechanische Schädigung der Leucocyten des Substrats
Schweiz. Med. Wschr. 87, S. 1253-57 (1957)

(36) M.M. HARGRAVES
The L.E.-Cellphenomen
Advances i. Intern. Med. 6 (1954)

(37) A. SUNDERMANN
Lehrbuch der inneren Medizin
Band 2, 2. Auflage 1965, S. 230
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

(38) A. STURM
Grundbegriffe der inneren Medizin
11. Auflage, 1965, S. 26
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

(39) G. SCHETTLER
Innere Medizin, kurzgefaßtes Lehrbuch, Band 2, S. 336,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1969)

(40) M. HAITINGER — Fluoreszenzmikroskopie
2. Auflage, Leipzigm (1959)
Akademische Verlagsgemeinschaft
Geest und Portig K.-G.

(41) H.L. HOLLEY — Drugs and the "lupus diathesis"
J. chron. Dis. 17: 1-4 (1964)

(42) H.L. HOLLEY — Drug therapy and the eiology of S.E.
Ann. intern. Med. 55:1036 (1961)

An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Dr. med. M. Alexander meinen aufrichtigen Dank sagen für die Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

Als Tochter des Arztes Dr. med. Horst D e b b e r t und seiner Ehefrau Ursula Debbert, geb. Leusch wurde ich am 6.9.1945 in Braunschweig geboren.

Meine Schulausbildung erhielt ich an der Evangelischen Gemeinde-Schule Neukölln und an der Albrecht-Dürer-Oberschule wissenschaftlichen Zweiges, an der ich im März 1966 das Zeugnis der Reife ablegte.

Im April 1966 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.

1968 machte ich das Physikum und werde voraussichtlich im März 1972 das Staatsexamen abgeschlossen haben.